

# **ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ЛАБИЛЬНЫЙ ПУЛ ЦИНКА И УСТОЙЧИВОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

**Е.И. Слобожанина, Ю.М. Гармаза**

*ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”,  
Минск, [slobozhanina@ibp.org.by](mailto:slobozhanina@ibp.org.by)*

Одним из самых распространенных микроэлементов во всех живых системах является цинк (второе место после железа), который существует в организме как двухвалентный катион и в физиологических условиях не проявляет редокс-активности. Именно это свойство в итоге и объясняет разнообразные физиологические функции цинка в различных биологических процессах. Например, цинк может быть представлен в качестве структурного, каталитического внеклеточного или внутриклеточного сигнального компонента [1]. Значение цинка для живых организмов впервые было выявлено в 1869 году в *Aspergillus niger*. Впоследствии, цинк был признан необходимым для нормального развития растений и для нормального роста крыс и птиц. Однако только в 1961 году цинк был идентифицирован как необходимый микроэлемент для людей, у которых проявлялись симптомы, связанные с его недостатком: тяжёлая анемия, замедление роста, гипогонадизм, аномалии кожных покровов [2]. После этого открытия были описаны многие симптомы, вызванные дефицитом цинка, в том числе диарея, алопеции, нарушения вкуса,

иммунная недостаточность, дисфункция головного мозга, нарушение заживления ран, потери аппетита, хроническое воспаление, заболевания печени и нейропсихические изменения, такие как эмоциональная нестабильность, раздражительность и депрессия [3].

Роль цинка в жизнедеятельности организма детерминирована в основном тем, что он входит в состав порядка 2800 белков, среди которых более 800 ферментов, принадлежащих ко всем классам – гидролазы, лигазы, трансферазы, оксидоредуктазы и лиазы/изомеразы. К основным из них относятся: щелочная фосфатаза, алкогольдегидрогеназа, Cu/Zn-супероксиддисмутаза (Cu/Zn-СОД), карбоксипептидаза, дегидрогеназа δ-аминолевулиновой кислоты (АЛАД), карбоангидраза, полимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты (α-ДНК-полимераза, ДНК-полимераза III), обратная транскриптаза. Среди физиологических функций цинка можно выделить биохимическую (кофактор ферментов и активность “цинковых пальцев”); клеточную (рост и клеточная пролиферация, стабилизация плазматической мембраны, репарация тканей и заживления ран); эндокринологическую (репродукция: сперматогенез и оогенез, функционирование тиреоидных гормонов и панкреатической железы, секреция пролактина); иммунологическую (функционирование нейтрофилов, Т-клеток, В-клеток и натуральных киллеров); неврологическую (внимание, память, восприятие органов вкуса, зрение); гематологическую (факторы коагуляции); скелетную (минерализация костей) [1].

Вопрос о количестве цинка, необходимого для нормального функционирования клеток, долго обсуждался в научной литературе. “Квотой цинка” называется общее содержание цинка в клетке, необходимое для ее оптимального роста. При пересчете “квоты цинка” на объем различных типов клеток получили сходство в концентрации этого металла – около 0.1–0.5 мМ (на одну клетку). Очевидно, что цинк распределяется в различной степени среди субклеточных органелл, но, тем не менее, эти расчеты действительно отражают аппроксимацию его внутриклеточного уровня. В большинстве типов клеток значительное количество внутриклеточного цинка связывается с белками и, таким образом, опосредует их важные структурные и каталитические функции. Эти семейства белков называют цинковыми металлопротеинами (“zinc proteome”). В дополнении к высокоаффинным сайтам, в клетке также существуют низкоаффинные Zn-связывающие сайты. Они включают слабосвязывающие сайты на белках, липидах, ДНК, а также низкомолекулярные компоненты, такие как органические анионы (например, цитрат), аминокислоты (гистидин) и глутатион. С учетом этих фактов стало очевидно, что свободный цинк в клетках присутствует в очень низкой концентрации от пМ до нМ. Термин “свободный” используется обычно для обозначения специфичного цинка, который является свободно доступным для связывания с вновь синтезированными цинковыми металлопротеинами, а внутриклеточная концентрация цинка в организме человека четко контролируется “импортерами” цинка (белки ZIPs/SLC39s), “экспортерами” цинка (белки ZnTs/SLC30s) и Zn-связывающими белками, такими как металлотioneины (MTs) [1, 4, 5].

В клетках млекопитающих цинк распределен следующим образом: в цитоплазме – 50%, ядре – 30–40% и мембране – около 10%. Предполагается, что общая концентрация клеточного цинка колеблется в диапазоне от десятков до сотен микромолей. Однако внутри клетки цинк связан с множеством белков и секвестрируется в органеллы и везикулы, и, следовательно, концентрация цитозольного лабильного  $Zn^{2+}$  очень низка. Считается, что она находится между пикомолярным и низким наномолярным диапазоном. Ряд исследований показали, что концентрация цинка может изменяться в ответ на различные стимулы (например, явления «цинковой волны» и «цинковой искры») и эти временные колебания цинка играют решающую роль в передаче сигналов [6]. Были получены данные также о лабильной концентрации цинка внутри органелл. Так, в митохондриях лабильный цинк определен на уровне 0,14 пМ, в митохондриальном матриксе – 0,2 пМ, в эндоплазматическом ретикулуме – 0,9 пМ, в системе Гольджи – 0,2 пМ [7–9]. В то же время в других исследованиях описаны более высокие концентрации лабильного цинка в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме – 300 пМ и 5 нМ, соответственно [10]. Это огромное рас-

хождение в концентрациях лабильного цинка в эндоплазматическом ретикулуме и системе Гольджи так и не нашло достаточно убедительного объяснения. Считается, что эти различия могут быть связаны с изменениями связывания лиганда или неправильным расчетом из-за вариаций в значениях pH или окислительном состоянии матрикса данных органелл, так как уровень цинка измерялся различными FRET системами. В связи с этим точный расчет концентраций лабильного цинка в цитозоле и матриксе субклеточных компартментов до сих пор является актуальным и имеет важное значение.

Цинк также обладает уникальной особенностью накапливается в ряде клеток и тканей, т.е. увеличивается его внутриклеточный лабильный пул. К наиболее известным примерам можно отнести нейроны коры больших полушарий, где 20% общего содержания цинка находится в синаптических везикулах глутаматергических нейронов в гиппокампе и коре головного мозга. По некоторым оценкам, из синаптических везикул выбрасывается до 100 мкМ цинка [11]. Простата – это еще одна ткань, в которой накопление цинка в 3–15 раз выше, чем его концентрации, обнаруживаемые в других мягких тканях (в среднем значения достигают 200 нмоль цинка/г средней массы) [12]. Тем не менее, высокие концентрации лабильного цинка резко снижаются при раке предстательной железы и карциномах, что указывает на важность цинка в правильном метаболизме простаты. Высокие концентрации цинка накапливаются в клетках поджелудочной железы, что необходимо для кристаллизации инсулина [13]. Аналогично, высокая концентрация цинка обнаруживается и в секреторных гранулах передней доли гипофиза, содержащих гормон роста [14].

В лаборатории медицинской биофизики ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси” выполнен цикл работ по установлению связи между цинковым гомеостазом и функционированием эритроцитов человека (в частности с индукцией программируемой гибели эритроцитов – эриптоза) и выявлению участия внутриклеточного лабильного пула  $Zn^{2+}$  в формировании защитных механизмов клеток при окислительном стрессе в норме и при патологии.

Используя специфический ионофор, внутриклеточный и внеклеточный хелаторы для  $Zn^{2+}$ , продемонстрировано существование специфических рецепторов на поверхности эритроцитов и внутриклеточных депо, отвечающих за поддержание цинкового гомеостаза. В то же время было показано, что увеличение цитозольного пула лабильного  $Zn^{2+}$  свыше 100 нМ приводит к запуску процессов эриптоза, а цитотоксические эффекты цинка обусловлены внутриклеточными молекулярными механизмами, приводящими к выходу  $Zn^{2+}$  из клеточных депо [15].

Воздействие  $H_2O_2$  в концентрациях 30–1000 мкМ на эритроциты человека *in vitro* приводит к дозозависимому увеличению внутриклеточного пула  $Zn^{2+}$  и ингибированию цитозольной эстеразной активности – основного маркера жизнеспособности эритроцитов, причем полученный эффект зависит от концентрации  $H_2O_2$  и времени инкубации клеток с ним. Выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного уровня лабильных ионов цинка и эстеразной активностью в клетках, подвергшихся воздействию пероксида водорода, что свидетельствует об участии  $Zn^{2+}$  в процессе программируемой гибели эритроцитов. Впервые продемонстрировано, что сочетанное воздействие пероксида водорода и внутриклеточного хелатора ионов цинка TPEN снимает цитотоксичный эффект  $H_2O_2$ , а добавление  $Zn^{2+}$  в среду инкубации эритроцитов с  $H_2O_2$  приводит к усилению его действия. Установлено, что одним из механизмов, приводящим к высвобождению  $Zn^{2+}$  из внутриклеточных связывающих сайтов в эритроцитах человека при  $H_2O_2$ -индуцированном окислительном стрессе, может являться уменьшение количества небелковых тиольных групп за счет снижения уровня восстановленного глутатиона [16].

Моделирование Zn-дефицитного состояния в эритроцитах человека с помощью внутриклеточного хелатора TPEN в субгемолитических концентрациях приводит к достоверному снижению внутриклеточного пула  $Zn^{2+}$  и увеличению эстеразной активности клеток, что не наблюдалось при истощении ионов цинка с помощью внеклеточного хелатора цинка DTPA. Продemonстрировано, что одним из возможных механизмов развития

окислительного стресса в эритроцитах человека в условиях дефицита цинка является ингибирование активности основных ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и глутатионпероксидазы, на фоне разнонаправленного изменения уровня восстановленного глутатиона. Выявлено, что именно снижение активности глутатионпероксидазы вносит вклад в активацию эритроцитарных эстераз в условиях дефицита ионов цинка. Более того, обнаружено увеличение экспрессии цистеин-обогащенных белков металлотионеинов в эритроцитах человека при моделировании Zn-дефицитного состояния *in vitro* [17, 18].

Оценка цитозольного пула лабильного цинка в эритроцитах периферической крови пациентов с сахарным диабетом II типа выявила снижение его количества, что, по-видимому, является индуктором в нарушении редокс-статуса клеток, что проявляется в 2–2.8-кратном снижении концентрации восстановленного глутатиона. Увеличение уровня экспрессии металлотионеинов на фоне значительного снижения уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах ИБС-пациентов с метаболическими нарушениями свидетельствует о функционировании данных цистеин-содержащих белков в качестве дополнительной антиоксидантной защитной системы эритроцитов человека при данной патологии. Разумеется, роль MTs, как захватчиков свободных радикалов до конца не выявлена, но представленные данные демонстрируют, что эти белки могут быть выбраны в качестве мишеней при назначении терапии кардиологическим пациентам с метаболическими нарушениями в целом и при наличии сахарного диабета 2 типа в частности [19].

Полученные результаты свидетельствуют о существовании в эритроцитах человека механизмов регуляции лабильного пула цинка и тонкой концентрационной грани между его “эссенциальными” и токсичными свойствами, нарушение которой может привести к запуску патологических процессов, что было продемонстрировано на примере сахарного диабета II типа, где цинковый гомеостаз играет важную роль в этиопатогенезе данной патологии.

#### **Список использованных источников**

1. Гармаза Ю.М., Слобожанина Е.И. Эссенциальность и токсичность цинка. Биофизические аспекты // Биофизика. – 2014. – Т. 59, Вып. 2. – С. 322–337.
2. Prasad A.S., Halsted J.A., Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. Am J Med 31: 532–546, 1961.
3. Devirgiliis C., Zalewski P.D., Perozzi G., Murgia C. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases // Mutat. Res. – 2007. Vol. 622. – P. 84–93.
4. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль // “Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук”. – 2016. – № 1. – С. 107–116.
5. Kambe T., Hashimoto A., Fujimoto S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases // Cell. Mol. Life Sci. – 2014. Vol. 71. – P. 3281–3295.
6. Haase H., Rink L. Zinc signals and immune function // Biofactors. – 2014. – Vol. 40. – P. 27–40.
7. Park J.G., Qin Y., Galati D.F., Palmer A.E. New sensors for quantitative measurement of mitochondrial Zn<sup>2+</sup> // ACS Chem. Biol. – 2012. – Vol. 7. – P. 1636–1640.
8. McCranor B.J., Bozym R.A., Vitolo M.I., Fierke C.A., Bambrick L., Polster B.M., Fiskum G., Thompson R.B. Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an *in vitro* model of ischemia/reperfusion // J. Bioenerg. Biomembr. – 2012. – Vol. 44. – P. 253–263.
9. Qin Y., Dittmer P.J., Park J.G., Jansen K.B., Palmer A.E. Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn<sup>2+</sup> with genetically encoded sensors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – Vol. 108. – P. 7351–7356.
10. Chabosseau P., Tuncay E., Meur G., et al. Mitochondrial and ER-Targeted eCALWY Probes Reveal High Levels of Free Zn // ACS Chem. Biol. – 2014. – Vol. 9. – P. 2111–2120.

11. Vogt K., Mellor J., Tong G., Nicoll R. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses // *Neuron*. – 2000. – Vol. 26. – P.187–196.
12. Franz M.C., Anderle P., Burzle M., et al. Zinc transporters in prostate cancer // *Mol. Aspects. Med.* – 2013. – Vol. 34. – P. 735–741.
13. Zalewski P.D., Millard S.H., Forbes I.J., et al. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc // *J. Histochem. Cytochem.* – 1994. – Vol. 42. – P. 877–884.
14. Petkovic V., Miletta M.C., Eble A., et al. Effect of zinc binding residues in growth hormone (GH) and altered intracellular zinc content on regulated GH secretion // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154. – P. 4215–4225.
15. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Гончарова Н.В., Слобожанина Е.И. Влияние внутриклеточного уровня ионов цинка на перераспределение фосфатидилсерина в мембранах и жизнеспособность эритроцитов человека // *Новости медико-биологических наук*. – 2011. – Т. 3, № 1. – С. 90–95.
16. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Канаш Ю.С., Зубрицкая Г.П., Кутько А.Г., Слобожанина Е.И. Внутриклеточный цинк: роль в H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированном окислительном стрессе в эритроцитах человека // *Биофизика*. – 2016. – Т. 61, вып. 6. – С. 1149–1158.
17. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Zn-дефицитные состояния в эритроцитах человека *in vitro* и свободнорадикальные процессы // *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. – 2017. – №3. – С. 54–63.
18. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В. Механизмы развития окислительного стресса при моделировании состояния дефицита ионов цинка в эритроцитах человека *in vitro* // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. – 2018. – Т. 3, №1. – С. 115–122.
19. Y. Harmaza, A. Tamashevski, E. Slobozhanina The role of metallothioneins in the maintenance of zinc homeostasis and redox state in erythrocytes of cardiologic patients with the metabolic disorders // *JIOMICS*. – 2019. – Vol. 96 Issue.1. – P. 10–16.